

ВВЕДЕНИЕ

Красноярский край располагает самыми значительными лесными ресурсами в Российской Федерации. Площадь лесов края 164 млн. га, что составляет 20.3% от общего лесного фонда России. В регионе преобладают хвойные породы деревьев (около 88%). Общий запас древесины лесного хозяйства Красноярского Края оценивается в 11.5 млрд. м³. Богатые лесные ресурсы обеспечивают не только высокие доходы от экспорта леса, но и существование развитого лесопромышленного комплекса, обеспечивающего производство пиломатериалов, древесных плит (ДСП, ДВП, фанера, шпон) и целлюлозно-бумажной продукции [39].

Однако, несмотря на значительные мощности ЛПК края, актуальной проблемой является накопление отходов деревообрабатывающей промышленности. Крупные отходы лесопиления и деревообработки перерабатываются в различные изделия или используются как топливо. Более мелкие отходы: опилки, стружки, древесная пыль и кора, намного реже используются как вторсырьё из-за необходимых значительных затрат на их переработку. Неиспользуемые опилки иногда помещаются в захоронения, но чаще всего накапливаются вокруг лесоперерабатывающих предприятий или на специальных полигонах. Скопившиеся мелкие отходы деревообработки представляют техногенную опасность, т.к. они высоко пожароопасные и оказывают негативное влияние на почву на участках предприятий лесного комплекса.

Самый распространенный отход деревообработки – опилки, характерны высоким содержанием органического вещества, и внесение их в качестве удобрения может оказать положительное влияние на производительный потенциал почвы, а также снизить количество складированной, потенциально опасной опилочной массы [14].

Несмотря на относительно высокие запасы древесины, существует необходимость восстановления ресурсного потенциала лесов для будущего лесопользования, а это значит, что необходимо и повышение уровня плодородия почвы, на которой была произведена вырубка и нарушен микробно-ферментный пул почвы [17]. Перспективным решением является использование опилочной массы в качестве основы для удобрительных композиций нового типа для лесовосстановления после вырубок.

Использование опилок в качестве удобрения связано с рядом проблем: внесение опилок приводит к азотному голоданию растений, опилки обладают высокой гигроскопичностью. При использовании опилок для выращивания сельскохозяйственных культур их насыщают высокими дозами минеральных удобрений, проводят длительное компостирование опилочной массы перед внесением в почву и смешивают опилки с торфом, навозом или другими органическими отходами.

В данной работе предложен способ создания опилочно-почвенных удобрительных композиций с использованием возможностей аборигенной почвенной микробиоты.

Цель настоящей работы: разработка опилочно-почвенных удобрительных композиций с добавлением микродоз удобрений для искусственного лесовосстановления.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- Разработка удобрительных композиций.
- Оценка динамики микробиологической и ферментативной активности почв с внесенными удобрительными композициями под насаждениями ели.
- Выявление наиболее перспективных удобрительных композиций для мобилизации микробно-ферментного комплекса почвы

Глава 1. Обзор литературы

Древесина это материал, получаемый из тканей высших растений, который состоит из лигнифицированных клеточных стенок растительных клеток и выполняет структурную, проводящую, защитную функции. Основным компонентом лигнифицированной клеточной стенки является лигноцеллюлозный комплекс – композитный материал, состоящий из полимеров: целлюлозы, гемицеллюлозы, пектиновых веществ и лигнина [28]. Древесина является источником углерода для почвенных микроорганизмов и играет ключевую роль в мировом круговороте углерода.

1.1 Состав древесины и ее деструкция в почве

1.1.1 Химическое строение древесины

Самым распространенным органическим природным полимером является целлюлоза, общая масса которой на нашей планете значительно превышает количество любого другого органического вещества биологического происхождения [9]. Целлюлоза это высокомолекулярный гомополимер, состоящий из β 1,4-остатков D-глюкозы, число которых варьирует от 3 до 25 тысяч в молекуле. Мономеры глюкозы в структуре целлюлозы образуют олигомеры – целлобиозы (D-глюкопиранозил- β -1,4-глюкопираноза). Целлюлоза составляет более 50% от сухого веса всех компонентов клеточной стенки растений. Нитевидные молекулы целлюлозы не разветвляются и собраны в пучки, называемые микрофибриллами или мицеллами. Каждая микрофибрилла может включать различное число молекул целлюлозы, но среднее значение колеблется в районе 60 молекул на микрофибриллу. Важной особенностью строения микрофибриллы является наличие аморфных зон и паракристаллических доменов, в которых между цепями молекул глюкозы возникают гидрофобные и водородные связи. Благодаря своему составу, целлюлоза устойчива к химическим и ферментативным воздействиям, а также прочна при растяжении как сталь. Всё это делает целлюлозу очень стабильным материалом и поэтому целлюлоза является каркасом, основой клеточной стенки растений. Более того, целлюлоза содержит мало легкодоступных низкомолекулярных веществ, таких как углеводы, арены, органические кислоты, которые являются питательными веществами для микроорганизмов, и поэтому целлюлоза устойчива к ферментативным воздействиям. Для гидролиза гликозидных связей целлюлозы химическим методом требуется длительное

нагревание в сильной кислоте, и именно подобные методы используются на гидролизных производствах. Несмотря на неподатливость к быстрому разложению, в природе целлюлоза активно перерабатывается при участии ферментативных систем бактерий, микромицетов, высших грибов и животных [13]. Нужно отметить, что для адекватной конверсии целлюлозы требуется не только наличие определенных ферментов, а также их скоординированное и последовательное действие, т.е. конверсия целлюлозы это не задача для отдельного микроорганизма, а для целого микробиома.

Гемицеллюлозы занимают второе место по распространённости в природе после целлюлозы. В растительных клетках гемицеллюлозы играют опорную и питательную роль.

Гемицеллюлозы – полисахариды, способные образовывать водородные связи с микрофибриллами целлюлозы. Гемицеллюлозы, связываясь с несколькими микрофибриллами целлюлозы, способствуют образованию разветвлённой сети из полисахаридов в клеточной стенке, поэтому их ещё называют связующими гликанами. Гемицеллюлозы разнообразны по свойствам и составу, так как в них входят: пентозы (D-ксилоза, L-арабиноза), гексозы (D-манноза, L-рамноза, D-галактоза, D-фруктоза) и уроновые кислоты. Эти соединения встраиваются в виде боковых ответвлений и, благодаря этому, в молекуле гемицеллюлозы могут образовываться β -1 \rightarrow 2-, β -1 \rightarrow 3-, β -1 \rightarrow 4 и β -1 \rightarrow 6-связи [21]. Гемицеллюлозы химически считаются легкогидролизуемыми полисахаридами, т.е. они способны вступать в реакции гидролиза с разбавленными кислотами при температуре 100° С. Однако, в природных условиях, гидролиз гемицеллюлоз осложняется тем, что гемицеллюлозы могут образовывать связи с паракристаллическими доменами микрофибрилл целлюлозы. Гемицеллюлозы, связанные с паракристаллическими доменами целлюлозы называются целлюлозаны. Они гидролизуются только вместе с целлюлозой и труднее извлекаются щелочами [56].

Лигнин занимает третье место по распространённости в природе после целлюлозы и гемицеллюлозы. Он является основным компонентом вторичных клеточных стенок растений. У древесных растений занимает 25-30% от сухой массы. Лигнин выполняет опорную функцию, заполняя собой пространство между микрофибриллами целлюлозы и гемицеллюлозы. Также выполняет защитную функцию.

В отличие от целлюлозы, лигнин представляет собой трехмерную сеть, состоящую из диметоксилированных (сирингил, S), монометоксилированных

(гваяцил) и неметоксилированных (*p*-гидроксифенил, Н) фенилпропаноидных единиц, произошедших от соответствующих *p*-кумариловых спиртов (кониферилового, пара-кумарового и синапового в различных соотношениях), которые являются предшественниками разнообразных субъединиц, включающих эфирные и С-С связи. Лигнин высокоустойчив к химической и биологической деградации, что придает высокую механическую устойчивость древесине. Лигнин обнаруживается в срединной пластинке, возникающей при делении клеток, а также в клеточной стенке растений (особенно во вторичной клеточной стенке), где он выполняет роль цемента между волокнами целлюлозы, а также образует аморфный матрикс с гемицеллюлозами, который защищает волокна целлюлозы от биodeградации [51]. Соотношение субъединиц лигнина широко варьирует в зависимости от таксономической принадлежности растения, а также от изучаемой ткани. Лигнин это сильноразветвлённый полимер фенольной природы.

Лигнин не встречается в свободном виде, всегда связан с полисахаридами клеточной стенки, очень устойчив к воздействию на него микроорганизмов, поэтому разлагается дольше, чем целлюлоза и гемицеллюлоза. Медленное разложение лигнина приводит к тому, что продукты его разложения накапливаются и служат основой для образования гумусовых веществ [2] .

Пектины – это гетерогенная группа кислых полисахаридов, которые включают остатки рамнозы, галактозы и арабинозы, а также галактуроновую кислоту в состав полимерной цепи. Пектины образуют гелевую фазу клеточной стенки, в которой находятся цепи целлюлозы и гемицеллюлозы. Пектины предотвращают слипание целлюлозной сети и функционируют как фильтр, определяющий проницаемость клеточной стенки для макромолекул. При увеличении содержания ионов кальция возрастает жесткость клеточной стенки за счёт сшивания кальцием отдельных молекул пектинов. Пектиновые вещества могут разлагаться бактериями, грибами и микромицетами [68].

Другими неструктурными компонентами древесины являются: вещества растворимые в органических растворителях, которые могут быть полярными (фенолы и танины) или неполярными (жиры и стеролы), водорастворимые вещества (сахара и крахмал), а также белки и зольные вещества [42].

1.1.2 Микробиологическая деструкция древесины

Целлюлоза производится множеством морских обитателей, поэтому считается, что деструкция целлюлозы появилась в глубокой древности, но наиболее бурное развитие получила в девонском периоде, с выходом высших растений на сушу [37]. Композитное строение клеточной стенки растений обуславливает необходимость применения не одного энзима, а сложного ферментативного комплекса для ее деструкции [35].

1.1.2.1 Биологические агенты деструкции лигноцеллюлозы

Способностью к деструкции лигноцеллюлозного комплекса клеточной стенки растений обладают бактерии, микромицеты и высшие грибы, однако наиболее эффективной и часто встречающейся в природе стратегией разложения лигноцеллюлозного комплекса является совместное воздействие на клеточную стенку растения ферментами, производимыми различными организмами [62]. Деструкция лигноцеллюлозы прокариотами является медленным процессом, из-за малого количества необходимых ферментов, особенно лигниновых пероксидаз. Однако, несмотря на медленное протекание биодеструкционных процессов многие представители таких родов, как *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clostridium*, вносят существенный вклад в конверсию лигноцеллюлозы и образование гумусового слоя почвы [47]. Например, к синтезу лигноцеллюлолитических ферментов способны следующие виды аэробных и анаэробных бактерий: *Bacillus polymyxa*, *Acidothermus cellulolyticus*, *Pyrococcus furiosus*, *Rhodospirillum rubum* и *Saccharophagus degradans* [30, 44, 61, 66]. Многие почвенные микроорганизмы были оценены по их способности разлагать целлюлозу, но выяснилось, что немногие из них обладают полным комплексом ферментов необходимых для разрушения [31, 46]. Наиболее перспективными в плане деструкции лигноцеллюлозного комплекса оказались микромицеты и грибы, такие как *Trichoderma*, которая производит полный набор экстрацеллюлярных ферментов: эндоглюканазы, экзоглюканазы и β -глюкозидазы [69]. Кроме представителей рода *Trichoderma*, таких как *Trichoderma viridae* в литературе есть сообщения о высокой лигноцеллюлитической активности других мезофильных микроорганизмов: *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium echinulatum*, *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* [48, 57, 58, 64].

Помимо микромицетов и бактерий огромную роль в деструкции лигноцеллюлозного комплекса играют базидиомицеты, благодаря развитым энзиматическим системам [25]. Также грибы, относящиеся к группам белой и

бурой гнили, находятся в центре внимания многих ученых из-за их возможности быстрого разложения лигноцеллюлозного комплекса [45]. Активность фенолоксидаз и лакказ, ферментов, участвующих в деструкции лигнина, настолько высока, что их применяют в целях биоремедиации, например, при очистке окружающей среды от загрязнения фенолсодержащими химическими соединениями [53, 67].

Как уже было отмечено ранее, в деструкции лигноцеллюлозного комплекса в природных условиях всегда принимает участие не один вид микроорганизмов, а множество видов бактерий, грибов и даже микроорганизмов. Они создают ферментный пул почвы, эффективность которого повышается благодаря синергетическому эффекту [70]. При создании удобрительных композиций эффективным вариантом может являться не выделение отдельных видов микроорганизмов, а использование аборигенной микробиоты, так как в ней уже присутствуют широко распространенные виды деструкторов целлюлозы, сохраняются синергетические связи и такое решение значительно снижает расходы в случае масштабирования производства для крупных лесовосстановительных мероприятий [8].

Благодаря микробиологической деструкции возможно протекание круговоротов элементов в природе. Микробиологическая деструкция в почве вносит значительный вклад в круговороты углерода, азота и фосфора. От того как протекает деструкция зависит почвообразование в данной местности, поэтому микробиологической деструкции органики в почве посвящена масса работ отечественных и зарубежных авторов [5, 15, 20].

По ходу микробиологической деструкции происходят следующие процессы: гумификация, минерализация, консервация.

1.1.2.2 Минерализация

Минерализация это биохимический процесс в результате, которого происходит полное разложение органических соединений до низкомолекулярных неорганических соединений, таких как CO_2 , H_2O , NH_3 , нитратов и т.п. Также при минерализации сложных веществ в почвенную среду высвобождаются сера, железо, фосфор, в результате чего образуются сероводород, сульфаты, сульфиты и соли железа. Минерализация органического вещества обеспечивает высвобождение химических элементов, которые находятся в иммобилизованной форме в тканях высших растений. Процесс минерализации обеспечивает нормальный круговорот веществ а в природе.

Процессы разложения биологических остатков имеют биокаталитический характер и происходят благодаря эндо- и –экзоферментным системам микроорганизмов [22]. Микроорганизмы из-за малых размеров, особенностей морфологии и иммунных систем обладают ограниченной возможностью поглощать и выделять высокомолекулярные соединения. В связи с этим гидролитическое расщепление высокомолекулярного субстрата, который микроорганизмы используют в качестве питания и основы для собственных молекул, происходит на начальной стадии в основном при помощи экзоферментных систем.

Белки расщепляются протеазами, сначала до более коротких пептидов, а затем и до аминокислот. При гидролизе сложных белков получаются не только аминокислоты, но и образуются фосфорная кислота, углеводы, азотосодержащие гетероциклические основания (пуриновые и пиримидиновые). При гидролизе жиров образуются насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, глицерин. А при гидролизе углеводов (целлюлозы, гемицеллюлозы, крахмала, ксиланов) получаются моносахара. При гидролитическом расщеплении лигнина, содержащего ароматические группировки (дубильные вещества, смолы) образуются терпеновые и изопреновые соединения, а также фенольные соединения. Получившиеся после гидролиза полимеров низкомолекулярные соединения проникают через цитоплазматические мембраны в цитоплазму микроорганизмов, где они подвергаются следующим химическим превращениям: окислению, восстановлению, дезаминированию, декарбоксилированию и затем полной минерализации [1].

Окислительно-восстановительные реакции, которые происходят во внутренней среде клетки очень разнообразны, и их характер определяется биохимической конституцией каждого отдельного вида микроорганизмов, составом разлагающихся соединений, а также степенью аэро-анаэробнозиса. При минерализации в аэробных условиях образуются минеральные соединения, содержащие кислород: CO_2 , H_2O , P_2O_5 , SO_2 , NO_2 , NO_3 . При минерализации в анаэробных условиях образуются соединения: CH_4 , H_2 , NH_3 , N_2 , H_2S [10].

1.1.2.3 Гумификация

Гумификация это процесс образования гумусовых веществ, таких как гуминовые и ульминовые кислоты, фульвокислоты и другие соединения, возникшие в результате физико-химического и биохимического преобразования органических веществ животного и растительного

происхождения [18]. Все гуминовые соединения представляют из себя комплексы, состоящие из ароматических колец, которые образуются в результате поликонденсации производных фенола и иных фенольных химических соединений, которые высвобождаются из лигнина и попадают в почву.

Гумус постепенно и медленно разлагается и служит важнейшим источником питания для растений. Основные свойства верхнего слоя почвы: структурность, плодородие, водный и воздушный режимы, тепловой баланс определяются гумусом. Образование гумусовых веществ происходит с разной интенсивностью в разных природных зонах и определяется совокупностью физико-химических факторов среды, а также растениями, преобладающими в данной местности. Участие микроорганизмов в создании гумуса можно представить следующим образом: сложные полимерные соединения растительного и животного происхождения перерабатываются микроорганизмами в простые и более реакционноспособные. Конденсация простых и реакционноспособных соединений успешно протекает при доступе кислорода и наличии микробных экзоферментов, типа лакказ, пероксидаз и фенолоксидаз. Затем органические соединения претерпевают реакции поликонденсации и изомеризации, в результате чего образуются органические соединения гумуса [12].

Процессы гумификации протекают не только в верхних слоях почвы, но и при формировании торфа на болотах, формировании угля, на дне водоемов, то есть везде, где происходит депонирование растительных остатков и создаются условия оптимальные для жизнедеятельности микроорганизмов [10,18].

1.1.2.4 Консервация

Консервация это процесс образования залежей химических элементов в иммобилизованном состоянии, например в виде нефти или каменного угля. При консервации многие химические вещества на короткий или длительный срок исключаются из круговоротов элементов. Процесс консервации не является самостоятельным, а представляет собой одну из специфических форм проявления минерализации – как следствие проявления заторможенности минерализационных процессов.

В естественных условиях представленные процессы никогда не встречаются изолированно, потому что даже при преобладании одного из процессов остальные также обнаруживаются, хоть и протекают в более слабой степени [16].

1.2 Компостирование

Как было показано в первой главе, древесина, а именно составляющие ее биологические полимеры, успешно разлагаются в почве множеством микроорганизмов. Однако процесс этот занимает много времени [38] и не контролируется человеком. За многие годы исследований были обнаружены способности микробиоты почвы разлагать не только древесину, но и органические отходы различного происхождения, такие как отходы сельского хозяйства, пищевые отходы, муниципальные отходы и отходы с очистных сооружений [34,36]. В ходе этих исследований была разработана обширная база по такому методу, как компостирование, которое позволяет ускорить процессы деструкции органического субстрата для получения желаемого продукта.

1.2.1 Техники компостирования

Компостирование это контролируемая аэробная конверсия смешанных органических материалов до состояния пригодного для внесения в почву. Основными целями создания компоста являются улучшение плодородия почвы и утилизация органических отходов [43]. Компосты представляют собой экономически выгодную замену синтетическим удобрениям, обеспечивают бактериальную среду необходимую для здоровой корневой системы растений [50]. Компосты улучшают гигроскопические свойства почвы, а также обеспечивают уничтожение семян сорняков, патогенных организмов и яиц насекомых. В компостах происходит комбинирование азота, фосфора и калия в соединения более пригодные для использования растениями. Таким образом, правильно приготовленный компост может быть очень полезной добавкой для почвы.

Существует множество разнообразных техник компостирования, однако все они включают некоторые общие стадии. Процесс начинается со сбора компонентов компостируемой биомассы, затем компоненты биомассы перемешивают или укладывают слоями и получают компостную тучу. Также необходимыми составляющими процесса компостирования являются увлажнение, аэрация, достаточная биомасса для самоизоляции и разложения из-за которых возникает подъем температуры. Было показано, что подъем температуры в компостной куче коррелирует с уровнем выработки микроорганизмами углекислого газа, что является прямым доказательством окислительных процессов, протекающих в компосте [23]. Компостные кучи подразделяют на четыре категории: открытые статичные кучи,

переворачиваемые и перемешиваемые кучи, искусственно аэрируемые статичные кучи, системы получения компоста в биореакторах [32].

Процесс разложения в компостной куче обеспечивает выделение тепла, из-за которого возникает конвективный ток воздуха, теплый воздух поднимается из кучи, а свежий воздух затягивается в кучу с краев и обеспечивает обогащение кучи кислородом. Оптимальный размер компостной кучи зависит от того аэрируется ли куча, переворачивается ли она или является статичной. В случае статичной кучи рекомендуется минимальный объем 1 м³, для достаточной теплоизоляции и нагрева.

1.2.2 Факторы компостирования

При создании компостов необходимо учитывать множество факторов, таких как отношение С:N, отношение С:Р, выбор источник углерода, размер частиц, размер компостной кучи, структуру компостной кучи, водный режим, рН, внесение штаммов микроорганизмов, аэрацию, температуру, время созревания компоста и т.д.

1.2.2.1 Источники углерода

В качестве источника углерода при компостировании чаще всего используются лигноцеллюлозные субстраты, такие как: бумага, картон, твердые отходы целлюлозной промышленности, опилки, меласса, альперухо – твердые отходы производства оливкового масла, отходы производства хлопка, отходы пивоварения, шелуха от какао бобов, стружка и щепа. Лигноцеллюлозные субстраты могут очень отличаться между собой, в зависимости от источника их получения. Поэтому в общем можно сказать лишь, что все виды лигноцеллюлозных субстратов могут быть успешно использованы в компостировании и только методом проб и ошибок можно определить относительную биоразлагаемость каждого материала, а также рекомендованные условия компостирования для каждого материалах [43].

1.2.2.2 Начальные отношения С:N и С:Р

Отношение содержания углерода к азоту это параметр, на котором часто акцентируется внимание при создании удобрений с помощью компостирования. Если отношение С:N слишком высокое, то температура в компостной куче может не достигнуть необходимо высокого уровня из-за недостаточной метаболической активности микробиоты, в то время как слишком низкое отношение С:N приводит к активизации процессов гниения,

результатом чего является появление неприятного запаха [54]. Рекомендуемым отношением C:N является отношение в пределах от 25:1 до 40:1, или 50:1. Существуют инструкции, содержащие таблицы C:N, для применения различных источников углерода и азота для создания удобрений, но при их использовании нужно обращать внимание на факторы, описываемые в данной главе [33].

В сравнении с отношением C:N, отношение углерода к фосфору менее изучено. Тем не менее, известно, что относительно низкое содержание фосфора может быть лимитирующим фактором при компостировании бумаги в которой ничтожно малое содержание фосфора [27]. Было установлено опытным путем, что при компостировании бумаги начальное отношение C:P должно находиться в диапазоне от 120:1 до 240:1.

1.2.2.3 pH и содержание солей

При компостировании рекомендуются начальные значения pH в диапазоне от 4.2 до 7.5. Производство молочной и уксусной кислоты бактериями на начальных стадиях разложения биомассы часто ведет к снижению и поддержанию pH в диапазоне от 4.2 до 5.5. В некоторых ситуациях, когда компостируемый материал слишком кислый, рекомендуют добавлять известь или золу уноса. Затем, в последующей термофильной стадии компостирования pH может подняться до 9, что приводит к появлению свободных форм азота в форме аммония. После термофильной стадии pH обычно падает до около нейтральных значений по мере созревания компоста [52].

При внесении щелочных компонентов в компост нужно действовать с осторожностью, так как избыточное содержание щелочей и высокий pH может привести к выделению аммиака [55]. Избыточная соленость компоста также несет отрицательные эффекты. В особенности проблема с соленостью компоста возникает при компостировании свиного навоза и внесение таких компостов ведет к угнетению некоторых видов растений.

1.2.2.4 Аэрация и увлажнение

Аэрацией обеспечивается жизнеспособность самых активных деструкторов — аэробов. Благодаря достаточной аэрации происходит отведение водяного пара и других газов, а также появляется возможность контроля над температурой.

Аэрация и увлажнение могут быть естественными и искусственными. При естественных аэрации и увлажнении возникают проблемы контроля внутренних условий компоста. Такой тип используется на приусадебных

хозяйствах, когда компостные кучи складываются на открытом воздухе, но даже в таком случае осуществляется периодический полив компостной кучи.

Искусственная аэрация компостной кучи может реализовываться при помощи трубок с воздухом или же происходить в биореакторе.

1.2.3 Микробиологические условия в компостах

Во время компостирования микроорганизмы превращают органическое вещество в CO_2 , биомассу, тепловую энергию и гумусовые конечные продукты. Органические субстраты, наполнители и добавки, используемые при компостировании, в основном растительного происхождения.

Микроорганизмам для нормального компостирования необходим источник углерода, макроэлементы, такие как азот, фосфор и калий, а также некоторые микроэлементы. Углеводородные соединения служат источником энергии и для микроорганизмов, а также углерод используется для построения собственных молекул. Часть полученной энергии используется для клеточного метаболизма, остальная часть испускается в виде тепла. Азот является критически важным элементом для микроорганизмов, потому что он входит в состав белков, нуклеиновых кислот, аминокислот, ферментов и коферментов, которые необходимы для клеточного роста и развития. При недостатке азота во время компостирования процессы деградации будут замедленными. С другой стороны, если в системе наблюдается избыток азота, то он часто уходит из системы в виде аммиака или иных соединений азота. Оптимальное отношение C/N составляет 25-40, но данное значение сильно зависит от субстрата и условий компостирования [41].

Микроорганизмы способны усваивать органические молекулы, растворенные в воде. Если содержание влаги упадет ниже критического уровня, за этим последует резкое снижение микробиологической активности. При избытке влаги произойдет снижение уровня кислорода и вымывание питательных веществ. При продолжительном сохранении анаэробных условий темпы разложения замедляются, и возникает неприятный запах [63].

При оптимальных условиях компостирование протекает в три фазы: мезофильная фаза, термофильная фаза, которая может длиться от нескольких дней до нескольких месяцев, и последняя фаза охлаждения и дозревания. Длительность фаз компостирования зависит от природы органического субстрата, используемого в компостировании и эффективности процесса деградации, которая определяется аэрацией и перемешиванием.

При начале компостирования, в компостной куче температура такая же, как в окружающей среде, а также обычно немного подкисленная среда. Растворимые и легкоусвояемые источники углерода, такие как моносахариды, крахмал, и липиды, используются микроорганизмами на ранней стадии компостирования. Наблюдается понижение pH, так как при деградации данных источников углерода образуются органические кислоты. На следующей стадии микроорганизмы начинают разлагать белки, из-за его происходит высвобождение аммония и увеличение pH. После того, как легко разлагаемые источники углерода иссякают, более сложные углеводородные субстраты, такие как целлюлоза, гемицеллюлоза и лигнин начинают деградировать и частично трансформироваться в гумус [29]. Гумус по большей части формируется из лигнина, полисахаридов и азотных соединений [40, 65]. Химические пути превращения органического вещества в гумус очень сложны и разнообразны, они включают реакции деградации и конденсации. В первую очередь лигнин разлагается экзоферментами до мономеров, которые затем поглощаются микроорганизмами и трансформируются в фенолы и хиноны. Затем эти вещества выводятся в окружающую среду вместе с оксидазами, где они полимеризуются по механизму свободных радикалов.

Компостирование это динамический процесс, включающий смену смешанных микробных популяций. Хотя общее количество микроорганизмов значительно не изменяется в процессе компостирования, микробиологический состав изменяется в зависимости от стадии компостирования [24]. Конкретный состав микробных популяций и количество микроорганизмов разнится в зависимости от субстрата и предшествующих популяций микроорганизмов [29].

В начале компостирования преобладают мезофильные бактерии, затем температура возрастает более 40 °C и начинают активно размножаться термофильные грибы и актиномицеты. Когда температура превышает 60 °C активность микроорганизмов резко падает, но после охлаждения мезофильные бактерии и грибы вновь начинают преобладать [49,59].

Глава 2. Объекты и методы исследования

2.1 Характеристика стационара «Погорельский бор»

Модельный эксперимент по созданию опилочно-почвенных удобрительных композиций с помощью компостирования и оценке их влияния на микробно-ферментативный комплекс почвы был поставлен на базе экспериментального хозяйства «Погорельский бор» Института леса СО РАН.

«Погорельский бор» - интразональный участок островной Красноярской лесостепи расположенный по левобережью Енисея, в бассейне р. Бузим на водоразделе двух ее притоков, в 38 км от г. Красноярска. Территория «Погорельского бора» относится к центральным районам Красноярского края. Географические координаты: 56°22'07.48" С.Ш. 92°57'17.95" В.Д.

В данном районе преобладают сосновые леса II-III классов бонитета. Произрастают березняки, единично встречаются ель, лиственница, во влажных понижениях – осина. Подлесок представлен шиповником, спиреей, боярышником, черемухой и др.

Абсолютные высоты колеблются в основном в пределах 250–300 м. Климат резко континентальный, умеренно-прохладный, средняя годовая температура +1,7 °С. Коэффициент континентальности по Конраду 52,6. Продолжительность вегетационного периода 144 дня. Число дней с температурой более 0 °С — 202–210, с температурой выше 5°С — 140–155, выше 10°С — 105–114 дней. Сумма температур выше 10°С. Среднегодовое количество осадков 470 мм, с колебаниями в отдельные годы 320–630 мм. Сумма осадков за теплый период года 330–350 мм, за холодный период года — 110– 120 мм. Почва питомника: темно-серая слабо-оподзоленная оглееная тяжелосуглинистая на древнеаллювиальных отложениях [4, 7].

2.2 Метод изготовления и применения удобрительных композиций

Для успешного применения опилочно-почвенных удобрительных композиций необходимо было изучить характеристики используемой почвы, а именно, ферменто-микробиологический состав. В ходе компостирования не использовались микроорганизмы интродуценты и процесс разложения полностью зависел от возможностей аборигенной микробиоты.

Для проведения эксперимента использовались: опилки сосны обыкновенной, которые пролежали более 2-х лет под навесом на открытом воздухе (средний размер приблизительно 5 мм в длину и ширину, толщина 2-3 мм), верхний слой почвы, взятый с пробного участка; вода, 30 саженцев ели сибирской (*Picea obovata*), деревянные коробки, карбонат кальция (по 150 г на каждый вариант) и 8 видов минеральных удобрений.

Для формирования микробно-ферментного пула и создания нового типа удобрительных композиций в почву были внесены 8 вариантов микродоз удобрений:

В середине вегетационного периода опилочно-почвенные удобрительные композиции были перевезены в лесной питомник на экспериментальный участок, с которого был снят слой почвы для компостирования. Получившиеся удобрительные композиции были заделаны в почву и в общей массе составили около 100 кг.

На почву с внесенными опилочно-почвенными удобрительными смесями были высажены двухлетние саженцы ели в трех повторностях на прямоугольных участках с разными вариантами удобрительных композиций. Также были высажены саженцы в контрольный вариант почвы без опилок. Таким образом, были посажены 30 сеянцев ели сибирской.

2.3 Микробиологический и биохимический анализ пахотного слоя почвы после применения опилочно-почвенных субстратов.

Энзимологический анализ почвы позволяет изучить уровень активности ферментов разных классов и видов. Ферментативная активность почвы выражено реагирует на изменения почвенного состава [6]. Существует прямая связь ферментативной активности с факторами почвообразования, свидетельствующая об изменении почв [3]. Установление связи активности ферментов и внесение различных опилочно-почвенных удобрительных композиций является важной предпосылкой для диагностики процесса биodeградации органического вещества и улучшения лесорастительных свойств почвы.

Для определения лесорастительных свойств почвы производили точечный отбор почвенных образцов на всех вышеописанных вариантах удобрительных композиций с глубины 0-10 см. Готовился смешанный образец, который далее высушивался и перерабатывался до пылевого состояния. С этим образцом проводились дальнейшие исследования.

2.3.2 Методы оценки ферментативной активности микробиоты почвы

Для анализа были выбраны следующие ферменты: уреазы, протеазы, инвертазы, фосфатазы, полифенолоксидазы и пероксидазы.

2.3.2.1 Уреазы

Уреазы (мочевина-аминогидролазы, КФ 3.5.1.5) являются одним из важнейших ферментов почвы, так как они катализируют гидролиз мочевины до аммиака и

углекислого газа. Аммиак в свою очередь служит непосредственным источником азотного питания для высших растений. Для исследования активности данного фермента азотного обмена, использовали методику Т.А.Щербаковой [19].

Ход анализа: 5 г воздушно-сухой почвы поместили в колбу ёмкостью 100 мл, прилили 20 мл 2%-ного раствора мочевины в фосфатном буфере (рН 6,7) и 200 мкл толуола. Колбу плотно закрыли и поместили в термостат при температуре 37°С на 4 часа. После экспозиции прилили 1 мл 50%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем для вытеснения из почвы поглощённого аммиака долили 50 мл 1н. раствора хлористого калия. Содержимое колб отфильтровали.

2 мл фильтрата поместили в мерную колбу объёмом 50 мл, развели водой до 30 мл, затем прилили 2 мл 50%-ного раствора сегнетовой соли 2 мл реактива Несслера. Колбы долили, перемешали, и окрашенный раствор колориметрировали при длине волны 400 нм. Контроли ставили с реактивами без почвы и с почвой без субстрата. В оба контроля после экспозиции также добавили трихлоруксусную кислоту. Содержание аммиака в фильтрате рассчитывали по стандартной кривой.

Активность уреазы выразили в миллиграммах N-NH₄ на 1 г почвы за 4 часа. По результатам анализа составили диаграмму.

Приборы и реактивы: фотоэлектроколориметр КФК-3, 2%-ный раствор мочевины в фосфатном буфере (рН 6,7), 50%-ный раствор сегнетовой соли, 50%-ный раствор CCl₃COOH, 1%-ный раствор KCl, реактив Несслера, стандартный раствор NH₄Cl в концентрации 0,005 мг N-NH₄ в 1 мл.

2.3.2.2 Инвертаза

Инвертаза (β-фруктофуранозид-фруктогидролаза. КФ 3.2.1.26) является гидролитическим ферментом, определяющим мобилизацию легкогидролизуемого углевода сахарозы, расщепляя ее на эквимольные количества глюкозы и фруктозы [26]. Инвертазу обнаруживают во всех почвах и ее активность является важным показателем, характеризующим биологическую активность почвы. Активность инвертазы была определена методом Гоффмана и Паллауфа [19].

К 5 г почвы добавили 5 мл 20% сахарозы и 5 мл ацетатного буфера. Поставили в термостат на 3 часа при температуре 37 °С, затем извлекли из термостата и добавили 40 мл воды при температуре 40 °С, отфильтровали.

Взяли 10 мл фильтрата в мерную колбу на 50 мл и добавили 4 мл медного реактива. Кипятили 25 минут на водяной бане. Быстро охладили (водопроводной водой), добавили 2 мл 0,2 м Na_2HPO_4 и добавили 5 мл молибденового раствора. Энергично взболтнули, через час долили до 50 мл и колориметрировали в кювете на 1 см при 620 нм.

Реактивы:

1. 20% сахароза
2. 2М ацетатный буфер: а: 120 мл ледяной уксусной кислоты разбавили водой до 1л. б: 164 г безводного CH_3COONa растворили в 1л., растворы а и б смешали (1:8).
3. Медный реактив: а: 50 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворили в 500мл воды б: 25г Na_2CO_3 25г сегнетовой соли, 20г NaHCO_3 200г Na_2SO_4 растворили в воде и довели объем до 1л. Хранили в термостате при 37⁰С. Перед употреблением растворы а и б смешали (1:25). 4) 0,2М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (71,63г на 1л воды).
4. Молибденовый раствор: а: 5% раствор молибдата аммония б: 200мл H_2SO_4 растворили в 800 мл воды. Смешали растворы а и б (1:1).

2.3.2.3 Фосфатаза

Фосфатаза (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты КФ 3.1.3.1-2) почвенный фермент, гидролизующий фосфоорганические соединения по фосфодиэфирным связям.

Фосфоорганические соединения составляют значительную часть фосфора почвы и представлены нуклеиновыми соединениями и фосфогуминовыми комплексами. Фосфоорганические соединения становятся доступными для растений при ферментативном гидролизе с отщеплением остатков фосфорной кислоты. Активность фосфатазы характеризует активность биохимических процессов мобилизации органического фосфора почвы. Для определения активности фосфатазы применяли метод Т.А. Щербаковой [19].

Ход анализа: На аналитических весах взяли навеску почвы 1 г, перенесли её в колбу на 50 мл. Прилили пипеткой 1 мл дистиллированной воды для увлажнения до 90%. Прилили пипеткой 1 мл 1%-го раствора

фенолфталеинфосфата натрия, закрыли корковой пробкой и взбалтывали 5 мин. Поставили в термостат на 1 ч при температуре 30 °С.

Прилили цилиндром 45 мл дистиллированной воды и взбалтывали 5 мин. Отфильтровали через беззольный фильтр в стакан. 10 мл фильтрата пипеткой перенесли в пробирку, добавили 1 мл 10%-го аммиака, перемешали. Окрашенный раствор колориметрировали при синем светофильтре 480 нм в стандартных кюветах шириной 1 см. Количество фенолфталеина, соответствующее взятому объему фильтрата, нашли по графику.

Фосфатазную активность выразили в миллиграммах фосфора на 1 г почвы за 24 ч.

Реактивы: 1%-й раствор фенолфталеинфосфата натрия, 10%-й водный аммиак, этиловый спирт-ректификат, насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов, стандартный раствор фенолфталеина: 0,01 г фенолфталеина растворили в 60 см³ этилового спирта и объем довели до 100 см³. 1 см³ этого раствора содержит 0,1 мг фенолфталеина. Далее отобрали аликвоты образцового раствора, соответствующие 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 мг P₂O₅ в 50 см³, окрасили, как и испытуемые растворы, колориметрировали и построили калибровочный график.

2.3.2.4 Пероксидаза

Пероксидаза (H₂O₂ – оксидоредуктаза. КФ 1.11.1.7) осуществляет окисление органических веществ почв (гетероциклических соединений, аминов, фенолов) за счет кислорода перекиси водорода и других органических перекисей, образующихся в почве в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Пероксидаза играет важную роль в процессах образования гумуса. Активность пероксидазы в образцах была измерена по методу Л.А. Карягиной, Н.А. Михайловой [19].

В качестве субстрата использовался гидрохинон, который окислился по действием пероксидазы в присутствии кислорода перекиси в 1,4-п-бензохинон, имеющий желтую окраску.

Ход анализа: 1 г почвы в конической колбе емкостью 50 мл залили 10 мл свежеприготовленного 1%-ного раствора гидрохинона, 1 мл 0.05%-ного раствора перекиси водорода, тщательно перемешали и поместили в термостат

на 30 мин при 30 °С. В качестве контроля поместили в термостат смесь растворов гидрохинона и перекиси водорода без почвы. После инкубации в опытные и контрольные колбы добавили по 10 мл этилового спирта, тщательно перемешали и отфильтровали через бумажные фильтры. Спиртовую вытяжку, имеющую желтую окраску, колориметрировали на фотоколориметре с синим светофильтром против контрольных растворов. Количество парабензохинона рассчитали по стандартной кривой, составленной с использованием раствора чистого парабензохинона. Активность пероксидазы выражалась в миллиграммах 1,4-бензохинона на 1 г почвы за 30 мин при 30 °С.

Реактивы: свежеприготовленный 1%-ный раствор гидрохинона, 0.05%-ный раствор H_2O_2 , этиловый спирт, стандартный раствор 1,4-п-бензохинона.

2.3.2.5 Полифенолоксидаза

Полифенолоксидаза (О-дифенол: кислород-оксидоредуктаза. КФ 1.10.3.1) участвует в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Полифенолоксидазы катализируют окисление фенолов (моно-, ди-, три-) до хинонов в присутствии кислорода воздуха. Хиноны в соответствующих условиях при конденсации с аминокислотами и пептидами образуют первичные молекулы гуминовой кислоты.

Активность полифенолоксидазы в образцах была измерена по методу Л.А. Карягиной, Н.А. Михайловой [19]

В качестве субстрата использовался гидрохинон, который окислился по действием пероксидазы в присутствии кислорода перекиси в 1,4-п-бензохинон, имеющий желтую окраску.

Ход анализа: 1 г почвы в конической колбе емкостью 50 мл залили 10 мл свежеприготовленного 1%-ного раствора гидрохинона, тщательно перемешали и поместили в термостат на 30 мин при 30 °С. В качестве контроля поместили в термостат смесь растворов гидрохинона и перекиси водорода без почвы. После инкубации в опытные и контрольные колбы добавили по 10 мл этилового спирта, тщательно перемешали и отфильтровали через бумажные фильтры. Спиртовую вытяжку, имеющую желтую окраску, колориметрировали на фотоколориметре с синим светофильтром (длина волны 400 нм) против контрольных растворов. Количество парабензохинона рассчитали по стандартной кривой, составленной с использованием раствора чистого

парабензохинона. Активность полифенолоксидазы выражалась в миллиграммах 1,4-бензохинона на 1 г почвы за 30 мин при 30 °С.

Реактивы: свежеприготовленный 1%-ный раствор гидрохинона, этиловый спирт, стандартный раствор 1,4-п-бензохинона.

2.3.3 Определение эколого-трофических групп почвы

Почвенная микробиота является наиболее многочисленным компонентом лесных систем. Под влиянием опилочно-почвенных субстратов неизбежно трансформируется структурное и физиологическое состояние почвенной микробиоты, поэтому были исследованы эколого-трофические группы микроорганизмов. Для определения эколого-трофических групп микроорганизмов был произведен посев почвенной суспензии (при разведении 10^3) на диагностические питательные среды: МПА (мясопептонный агар), КАА (крахмал-аммиачный агар), СА (сусло-агар), ПА (почвенный агар). Посевы выполнялись на чашки Петри в трёх кратной повторности, затем поместили в термостат при 25-27 °С на 7 дней. Учёт бактериальных колоний проводили на третьи сутки.

При обработке результатов исследования применялись биометрические методы [11] и программы пакета Microsoft Office 2010. Достоверность различий оценивалась по критерию Стьюдента при уровне значимости $p = 0,05$.

3. Результаты и обсуждение

Были подобраны 9 вариантов опилочно-почвенных удобрительных композиций с добавлением микродоз различных минеральных удобрений. Был поставлен эксперимент в полевых условиях на базе стационара «Погорельский бор», в ходе которого в почву были внесены около 100 кг опилочно-почвенной смеси с добавлением минеральных удобрений и высажены 30 двухгодичных саженцев ели сибирской (*Picea obovata*).

Для оценки ферментативной активности микробиоты в почвах с внесенными удобрительными композициями отобранных образцов методами почвенной энзимологии было измерено содержание уреазы, инвертазы и фосфатазы, пероксидазы и полифенолоксидазы. На основании данных об активности полифенолоксидазы и пероксидазы был рассчитан коэффициент гумификации.

Также были произведены посеы микроорганизмов из отобранных проб для подсчета количества представителей различных эколого-трофических групп, что дало нам общее представление об условиях для развития микробиоты в удобрительных композициях.

3.1 Ферментативная активность микробиоты почвы с добавлением удобрительных композиций

Через год после закладки опилочно-почвенных удобрительных композиций в почву были измерена активность ферментов уреазы, инвертазы и фосфатазы. Ровно через год был произведен повторный отбор проб и измерения для отслеживания динамики.

3.2.1 Активность уреазы в почве с вариантами удобрительных композиций

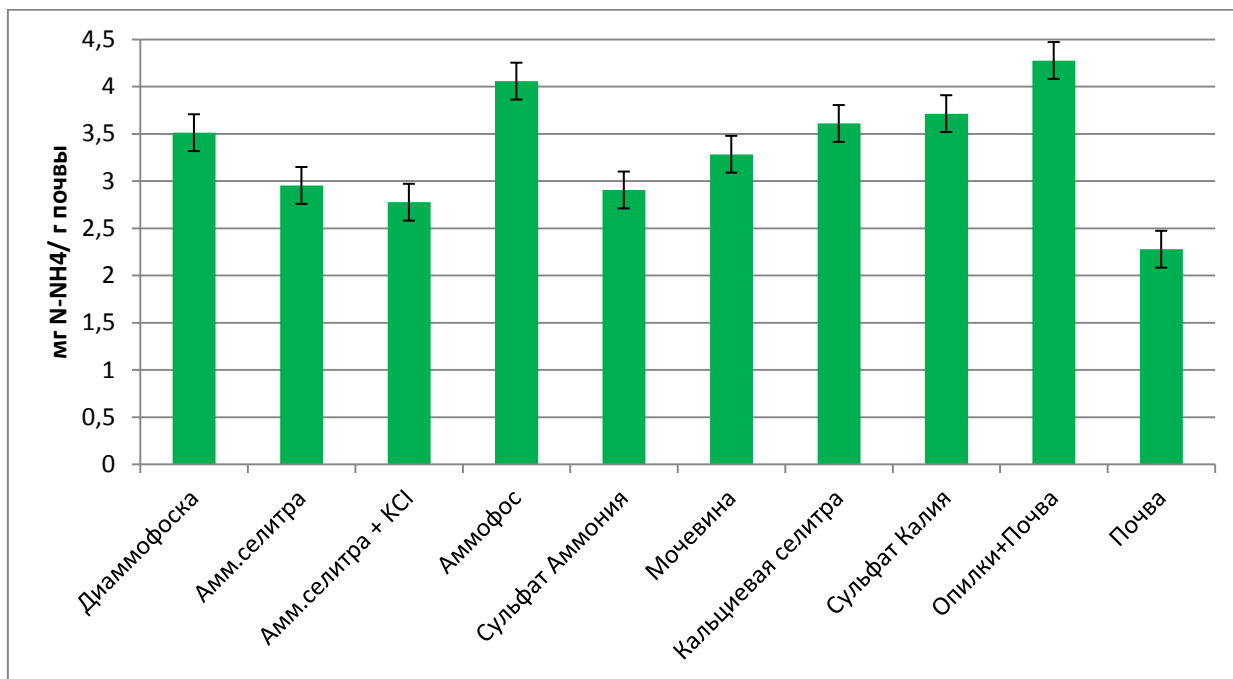


Рисунок 1 - Активность уреазы в почве с вариантами удобрительных композиций через год после внесения.

При внесении опилочно-почвенных субстратов наблюдалось увеличение содержания уреазы. Наиболее интересным результатом оказалось то, что внесение смеси опилок и почвы без добавления микродоз удобрения привело к наибольшему содержанию уреазы в почве – 5,5 мг N-NH₄/мг почвы. Наименьшее содержание уреазы обнаружили в контрольном образце почвы - 2,5 мг N-NH₄/мг почвы. Из этого можно сделать вывод, что внесение опилок привело к увеличению уреазной активности почвы. На втором месте по активности уреазы после опилочно-почвенной смеси оказались варианты опилочно-почвенных композиций с добавлением сульфата калия и аммофоса 5мг N-NH₄/мг почвы.

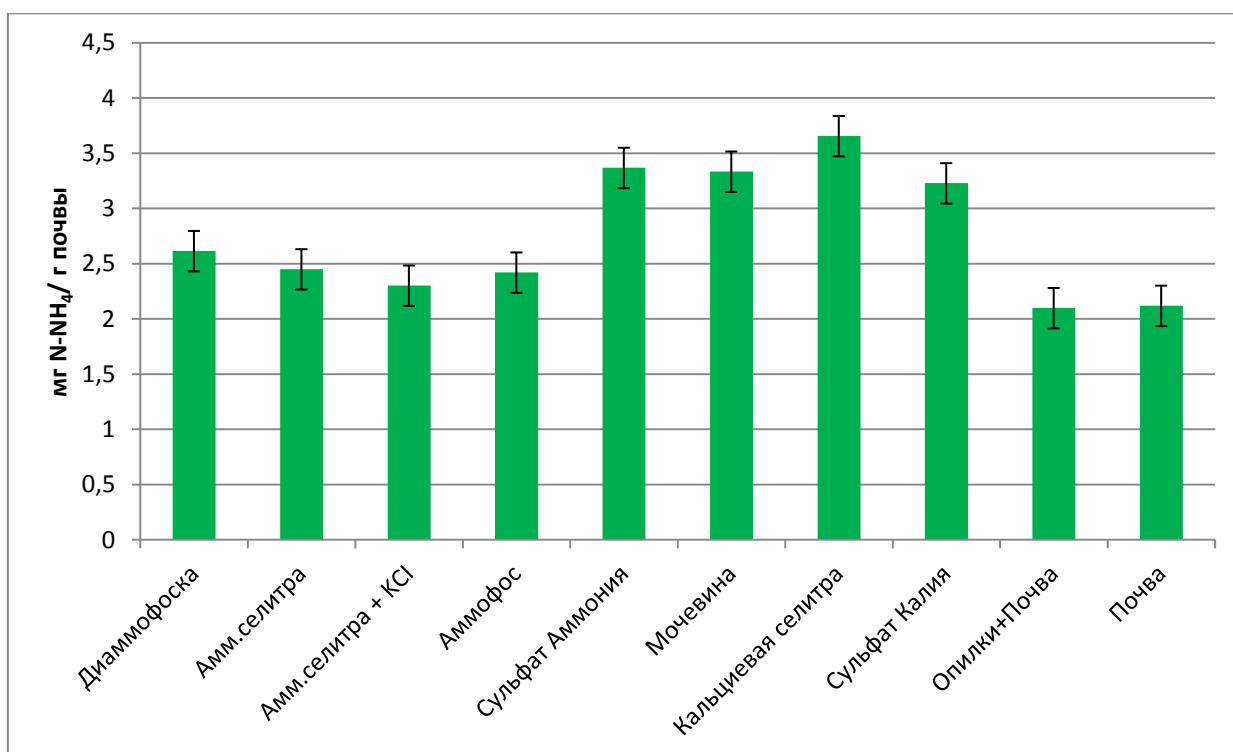


Рисунок 2 – Активность уреазы в почве с вариантами удобрительных композиций через два года после внесения

Через два года после внесения удобрительных композиций в почву все еще наблюдается повышенное содержание уреазы в вариантах с добавлением удобрений, в отличие от контрольного варианта и варианта без добавления удобрений, а только опилок.

Наблюдается общее снижения количества уреазы в образцах в сравнении с первым годом, но в вариантах с сульфатом аммония, мочевиной, кальциевой селитрой и сульфатом калия осталось на уровне первого года и составило более 3 мг N-NH₄ на г почвы. Наибольшее содержание уреазы наблюдалось в варианте с кальциевой селитрой 3.7 мг N-NH₄. Наименьшее содержание уреазы наблюдалось в варианте опилки + почва и составило 2.1 мг N-NH₄.

3.2.2. Активность инвертазы в почве с вариантами удобрительных композиций

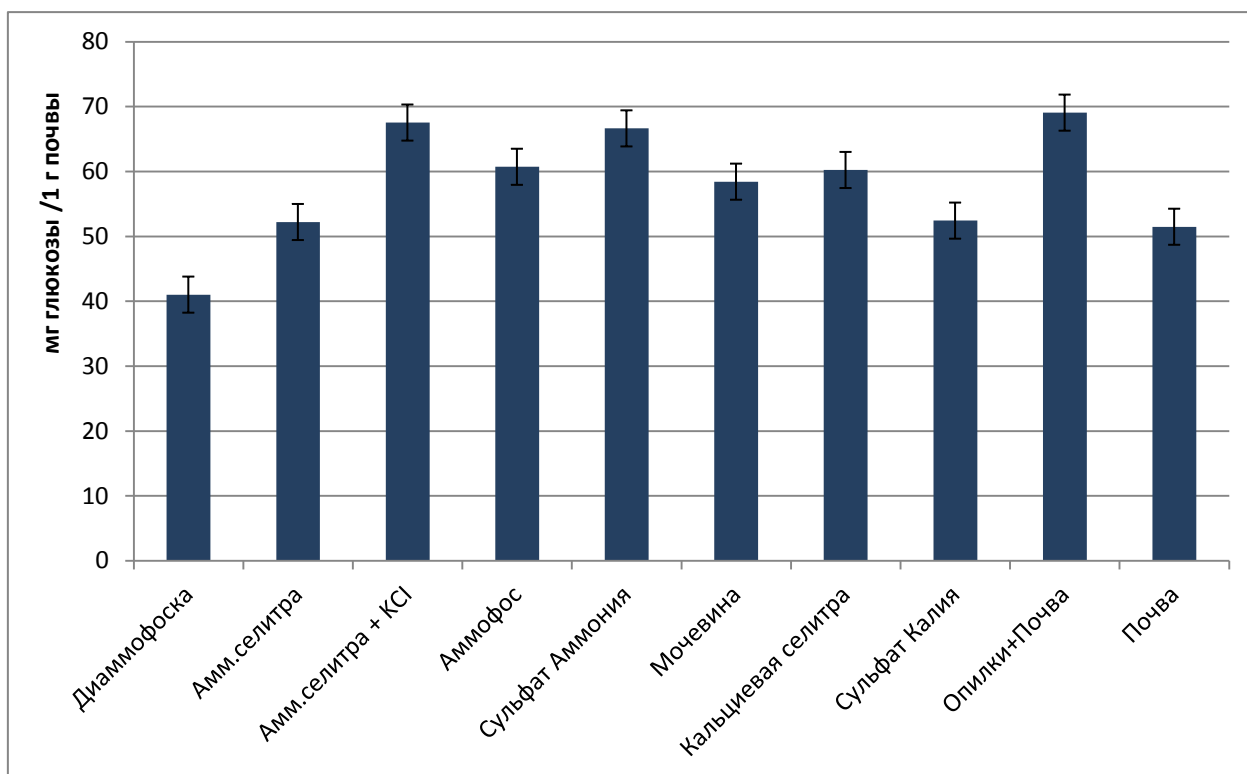


Рисунок 3 - Активность инвертазы в почве с вариантами удобрительных композиций через год после внесения

Полученные данные содержания инвертазы в почве с добавлением различных вариантов удобрительных композиций были представлены в виде диаграммы. Активность инвертазы выражали в мг глюкозы/1 г почвы. Наибольшая активность инвертазы наблюдалась в варианте без добавления удобрений (опилки+почва) и составила 68 мг глюкозы на 1 г почвы. Наименьшая активность инвертазы наблюдалась в варианте с диаммофоской и составила 42 мг глюкозы на 1 г почвы. Высокую активность инвертазы показали варианты с добавлением аммиачной селитры, аммофоса, сульфата аммония, мочевины и кальциевой селитры, они находятся приблизительно на одном уровне. Более высокое содержание инвертазы, чем в контрольном образце, наблюдалась в вариантах опилки+почва, кальциевая селитра, мочевина, сульфат аммония, аммофос, аммиачная селитра + KCl.

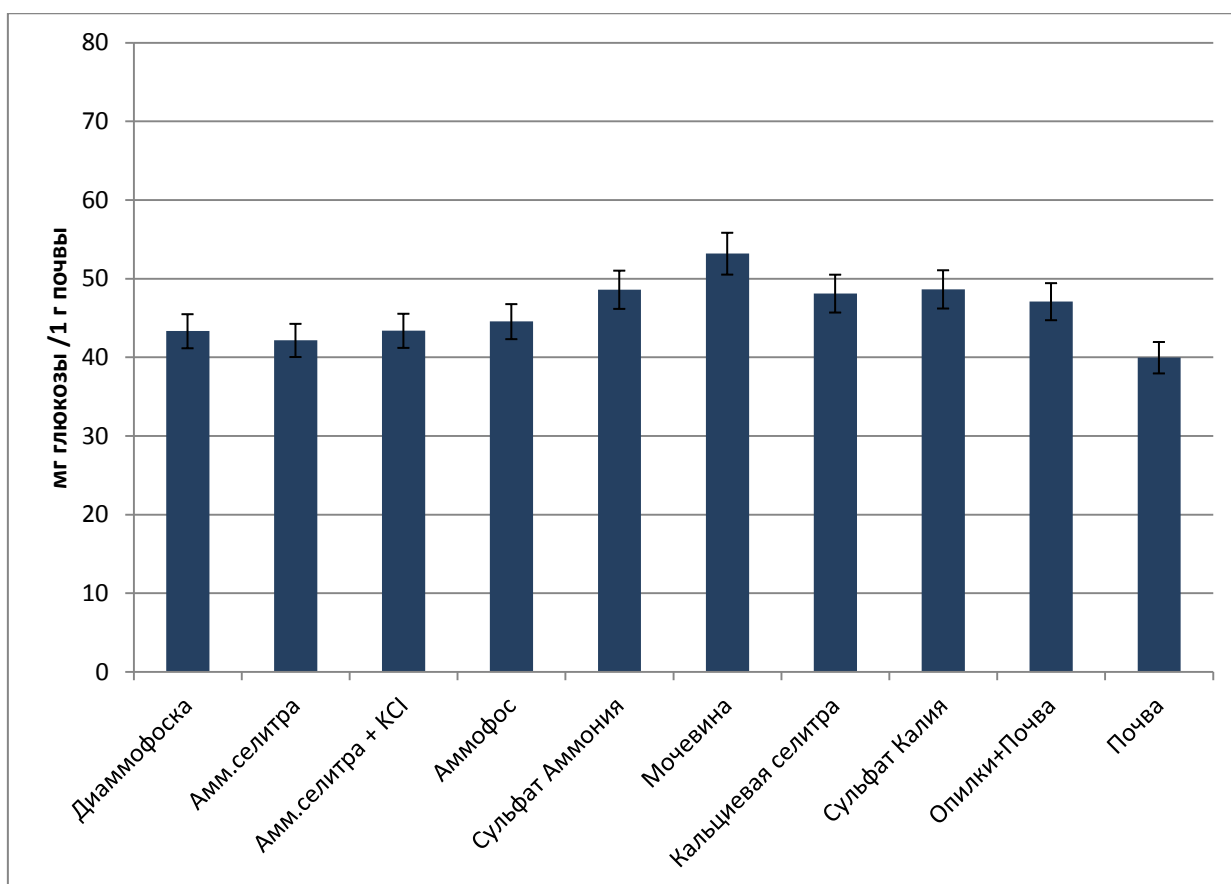


Рисунок 4 - Активность инвертазы в почве с вариантами удобрительных композиций через два года после внесения

Через два года после внесения опилочно-почвенных удобрительных композиций в почву при подсчете количества инвертазы в почве наблюдается общее снижение инвертазы во всех вариантах, кроме варианта с диаммофоской, где уровень остался прежним. Наибольшее содержание инвертазы через два года наблюдалось в варианте с мочевиной и составило 53 мг глюкозы/ 1 г почвы. Наименьшее содержание инвертазы наблюдалось в контрольном варианте.

Меньшее содержание инвертазы в контрольном варианте может объясняться тем, что в остальные добавлены опилки, которые являются углеродным субстратом и для деструкции и использования целлюлозы из опилок были мобилизованы дополнительные ферментативные силы микробиоты.

3.2.3 Активность фосфатазы в почве с вариантами удобрительных композиций

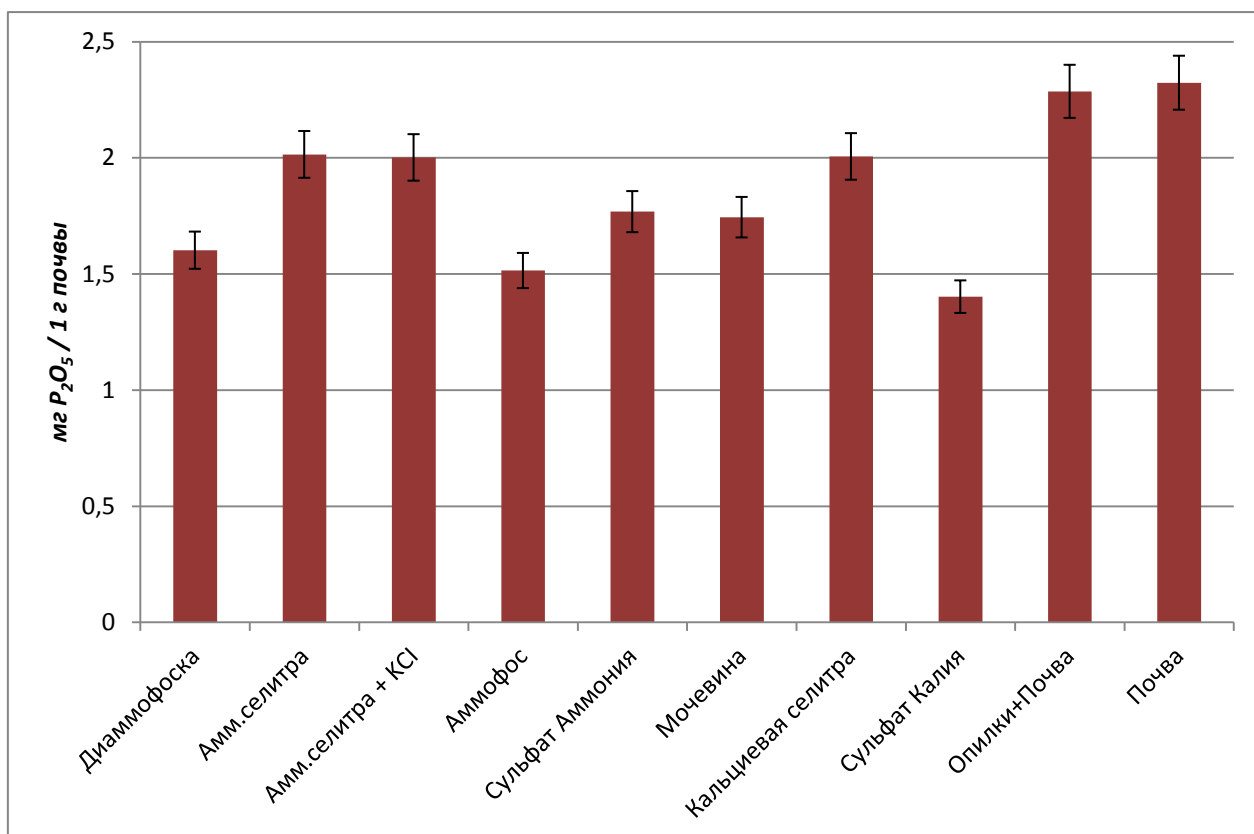


Рисунок 5 – Активность фосфатазы в почве с вариантами удобрительных композиций через год после внесения

Активность фосфатазы в образцах находилась в диапазоне от 0.6 до 1.2 мг фосфора/г почвы (рис 7). Наибольшая активность фосфатазы проявилась в варианте с диаммофоской и составила 1.2 мг фосфора/г почвы. Наименьшая активность фосфатазы наблюдалась в варианте с применением аммиачной селитры и KCl и составила 0,6 мг фосфора/г почвы. Остальные варианты удобрительных композиций занимают промежуточное положение.

Примечательно, что в вариантах без добавления азотных удобрений содержание фосфатазы больше, чем в вариантах с добавлением. В варианте опилки+почва такое же содержание фосфатазы, как и в контрольном варианте. Поэтому можно предположить, что внесение азотных удобрений влияет на метаболизм фосфора и уменьшение количества фосфатазы в почве.

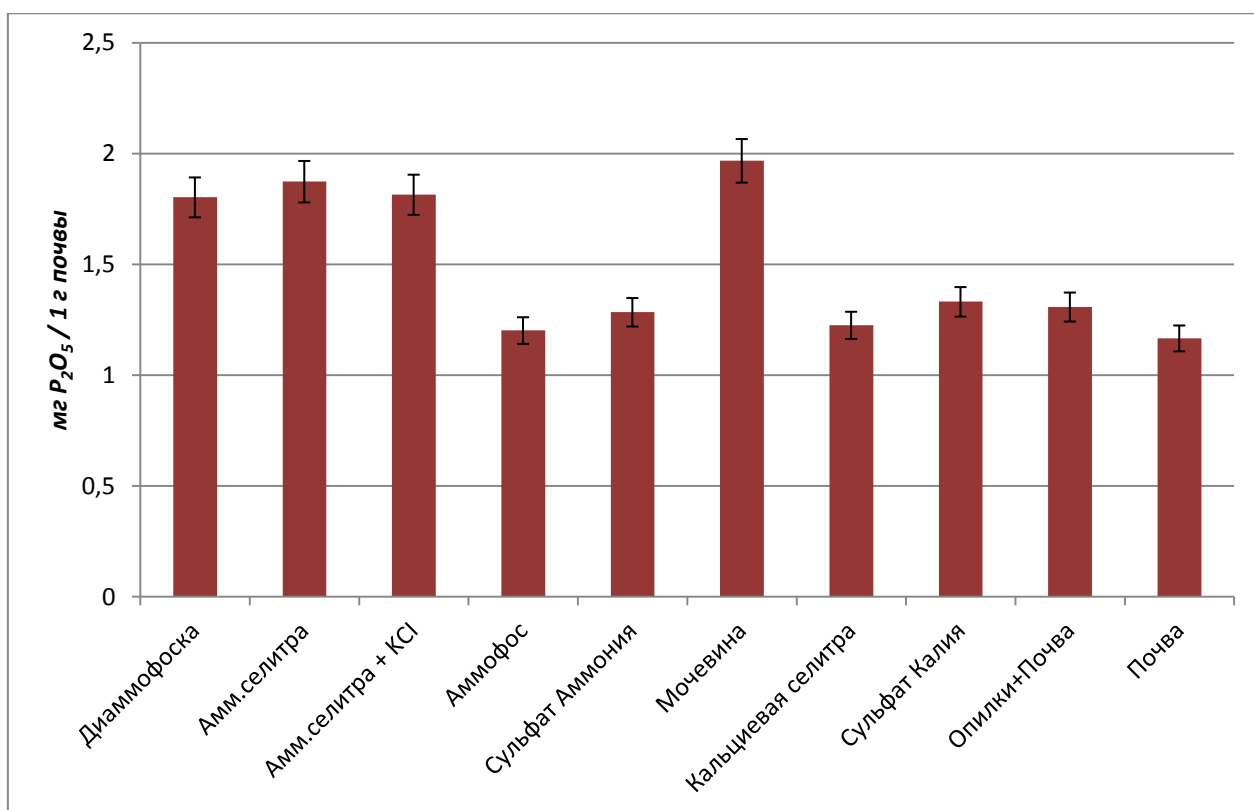


Рисунок 6 - Активность фосфатазы в почве с вариантами удобрительных композиций через два года после внесения

Наибольшая активность фосфатазы в пробах, взятых на второй год после внесения удобрительных композиций, была обнаружена в образце из варианта с мочевиной и составила 1.9 мг фосфора / 1 г почвы. Также высокое содержание фосфатазы наблюдалось в вариантах с диаммофоской, аммиачной селитрой и аммиачной селитрой с добавлением хлорида калия. В остальных же вариантах содержание фосфора было на уровне с контрольным образцом.

3.2.4 Активность пероксидазы и полифенолоксидазы в почве с вариантами удобрительных композиций. Коэффициент гумификации.

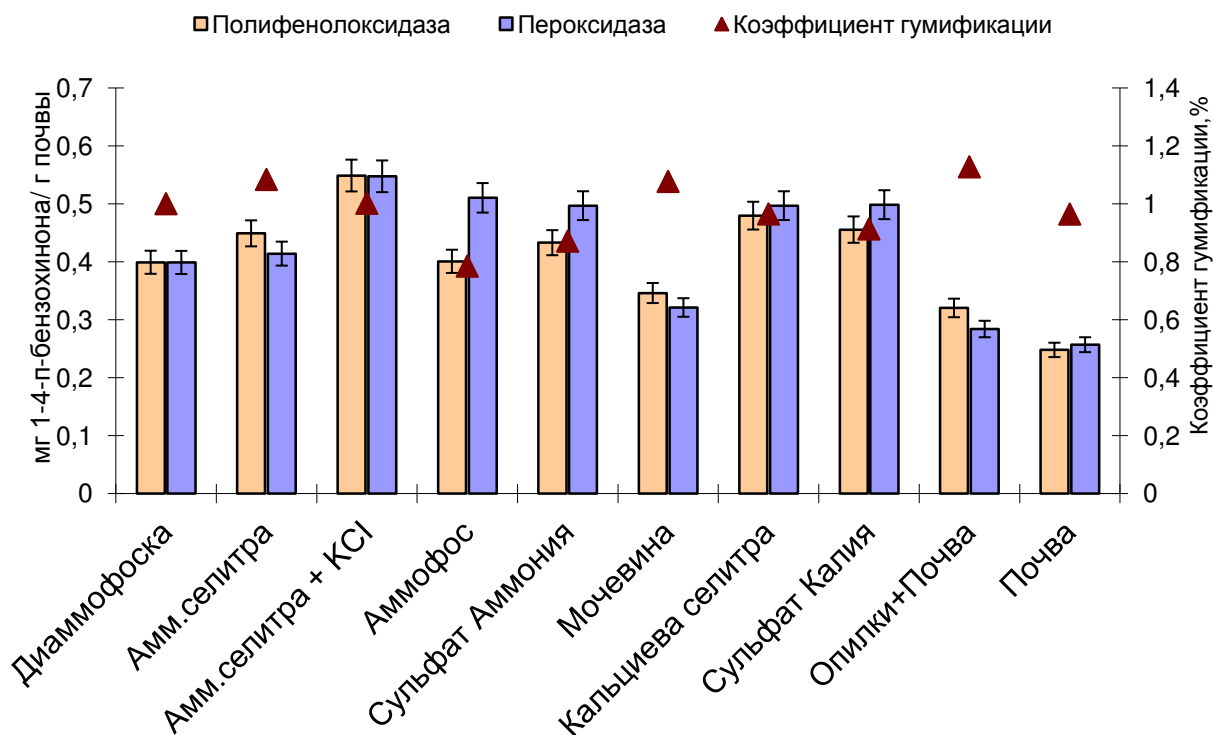


Рисунок 7 - Активность пероксидазы, полифенолоксидазы и коэффициент гумификации в почве с вариантами удобрительных композиций через год после внесения.

Наибольшая активность пероксидазы и полифенолоксидазы через год после внесения удобрительных композиций наблюдалась в варианте с внесением аммиачной селитры с хлоридом калия. Активность пероксидазы и фенолоксидазы была одинакова и составила 0.57 мг 1-4-п-бензохинона на 1 г почвы. Коэффициент гумификации составил 1%. Наименьшая активность полифенолоксидазы и пероксидазы наблюдалась в контрольном образце и составила 0,26 мг 1-4-п-бензохинона на 1 г почвы, однако коэффициент гумификации в контрольном образце не на много отличался от коэффициента гумификации в образце с аммиачной селитрой с добавлением хлорида калия. Коэффициент гумификации в контрольном образце 0.9%. Наименьший коэффициент гумификации обнаружен в варианте с добавлением аммофоса, он составил 0.8%.

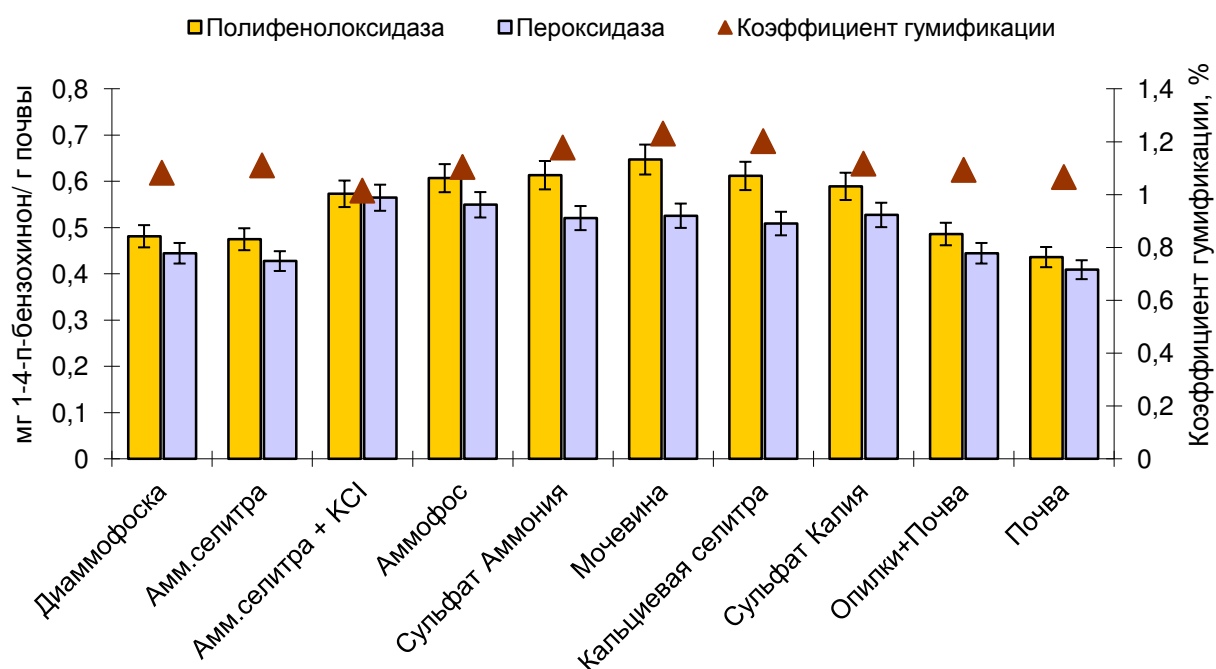


Рисунок 8 - Активность пероксидазы, полифенолоксидазы и коэффициент гумификации в почве с вариантами удобрительных композиций через два года после внесения.

Наибольшая активность полифенолоксидазы через два года после внесения удобрительных композиций наблюдалась в вариантах с мочевиной, сульфатом аммония и кальциевой селитрой. В варианте с мочевиной активность полифенолоксидазы составила 0.6 мг 1-4-п-бензохинона на 1 г почвы. Наименьшая активность полифенолоксидазы, как и в первый год, наблюдалась в контрольном образце. Наибольшая активность пероксидазы наблюдалась в варианте с аммиачной селитрой и хлоридом калия и составила 0.58 мг 1-4-п-бензохинона на 1 г почвы. Наименьшая активность пероксидазы наблюдалась в контрольном варианте и варианте с добавлением только аммиачной селитры и составила 0.43 мг 1-4-п-бензохинона на 1 г почвы.

Наибольший коэффициент гумификации был в варианте с мочевиной – 1.2%, во всех образцах коэффициент гумификации не падал ниже 1%.

По наблюдениям за два года видно, что активность полифенолоксидазы и пероксидазы повысилась во всех вариантах с добавлением опилок, что может свидетельствовать о мобилизации микробиоты лигнодеструкторов.

3.3 Эколого-трофические группы микроорганизмов

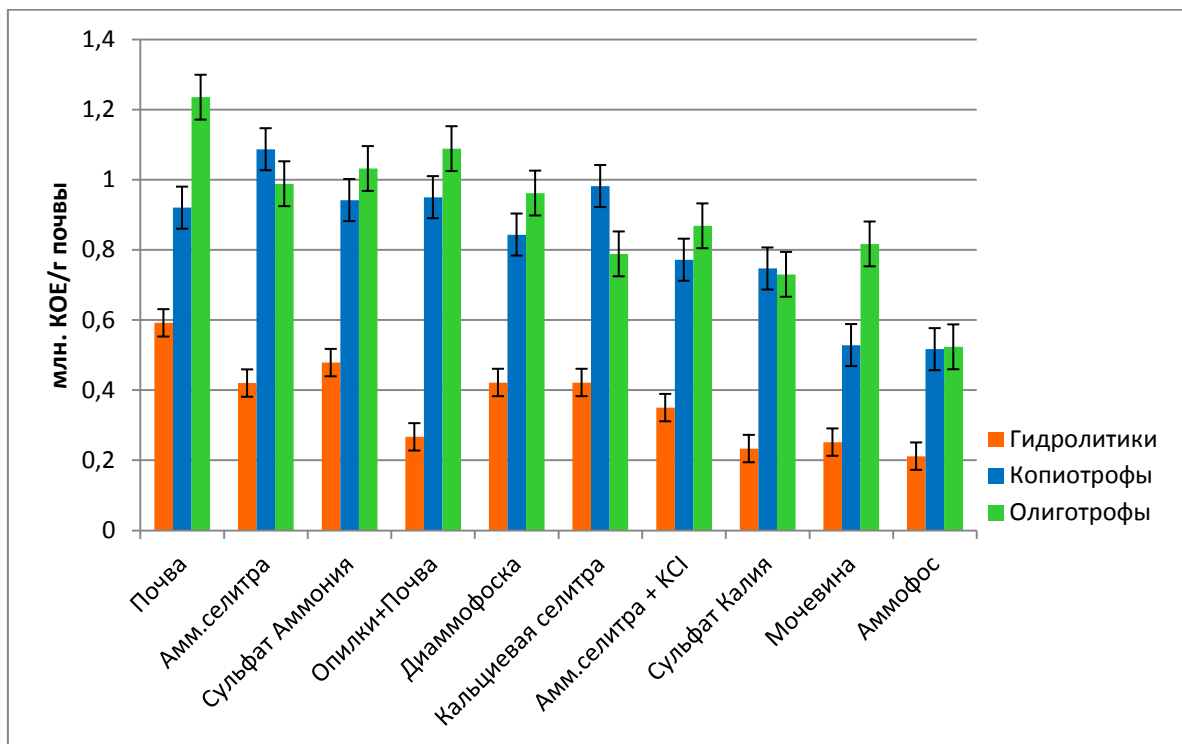


Рисунок 9 – Эколого-трофические группы почвы через год после внесения удобрительных композиций

На диаграмме (рис. 9) представлены результаты подсчета эколого-трофических групп в почве через год после внесения опилочно-почвенных удобрительных композиций. Столбцы диаграммы расположены в порядке убывания общего числа микроорганизмов в образце.

В почве без применения удобрительных композиций наблюдается большее количество олиготрофов – 1,2 млн. КОЕ/1 г почвы. Содержание копиотрофов в почве составило 900 тыс. КОЕ/1 г почвы. Содержание гидролитиков составило 600 тыс. КОЕ/1 г почвы. В контрольном образце наблюдается наибольшее содержание олиготрофов и гидролитиков, чем во всех вариантах с добавлением опилок и удобрений. В вариантах: опилки+почва, с добавлением кальциевой селитры, сульфата аммония, аммиачной селитры содержание копиотрофов выше или такое же, как и в контрольном образце. Наименьшее содержание микроорганизмов наблюдалось в варианте с добавлением аммофоса.

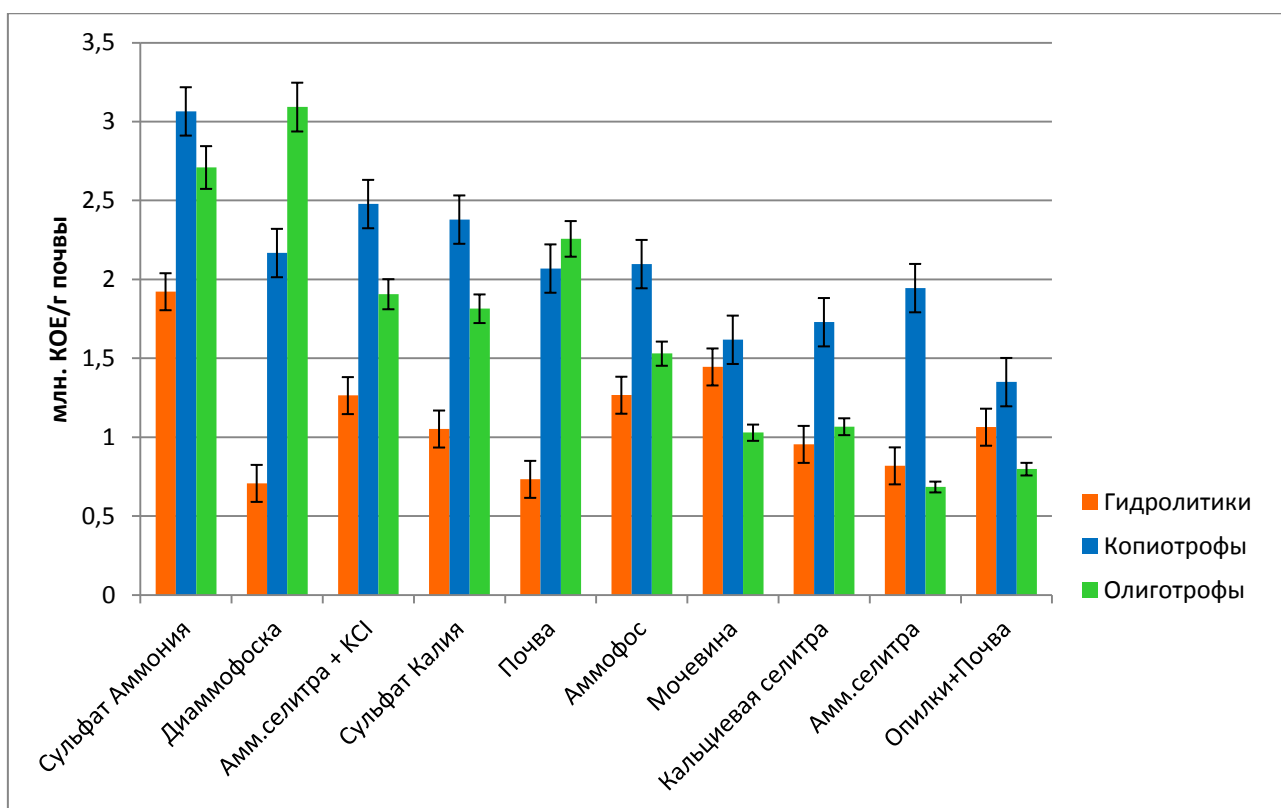


Рисунок 10 - Эколого-трофические группы микроорганизмов в почве через два года после внесения удобрительных композиций

На диаграмме (рис. 10) видно, что через два года после внесения удобрительных опилочно-почвенных композиций изменилось соотношение эколого-трофических групп, а также общее число микроорганизмов, относительно первого года. Во-первых, увеличилось общее число микроорганизмов почти в два раза. Однако такое увеличение наблюдается и в контрольном образце, так что это обусловлено внешними факторами среды, а не внесением удобрений. Во-вторых, во всех образцах, кроме варианта с диаммофоской и контрольного образца количество копиотрофов превысило количество олиготрофов.

Наибольшее число микроорганизмов наблюдалось в варианте с сульфатом аммония: 3.5 млн. КОЕ/г почвы копиотрофов, 2.7 млн. КОЕ/г почвы олиготрофов и 1.8 млн. КОЕ/г почвы гидролитиков. Наименьшее число микроорганизмов наблюдалось в варианте опилки+почва.

Выводы

1. Были подобраны варианты опилочно-почвенных удобрительных композиций с микродозами удобрений, которые внесли в почву.

2. Через год наибольшая активность: уреазы наблюдалась в варианте опилки + почва, инвертазы в варианте опилки + почва и варианте с аммонийной селитрой + KCl, фосфатазы в варианте с диаммофоской, оксидаз в варианте с аммиачной селитрой и KCl. Через 2 года наблюдалась наибольшая активность: уреазы в вариантах с сульфатом аммония, мочевиной, кальциевой селитрой, сульфатом калия; инвертазы в вариантах с сульфатом аммония, мочевиной, сульфатом калия; фосфатазы в вариантах с мочевиной и аммонийной селитрой; оксидаз в вариантах с мочевиной и сульфатом аммония.
3. В первый год после применения удобрительных композиций наибольшее количество микроорганизмов наблюдалось в контрольном варианте. Контрольный вариант наиболее насыщен микроорганизмами и в особенности гидролитами, что указывает на наиболее активные процессы почвообразования в самой почве, чем в вариантах с добавлением опилок и микродоз удобрений. Во второй год после применения удобрительных композиций под насаждениями ели наибольшее количество микроорганизмов наблюдалось в варианте с сульфатом аммония. Отмечено общее снижение количества олиготрофов, относительно копиотрофов, что указывает на увеличение количества свободных питательных веществ в почве и ее обогащение.
4. Наиболее перспективным для дальнейшего изучения и применения является вариант опилочно-почвенной удобрительной композиции с сульфатом аммония, так как он показал наиболее высокие показатели и стабильные результаты по большинству проведенных испытаний.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Л. Н. Органическое вещество почвы и процессы ее трансформации: монография / Л.Н. Александрова. - Ленинград: Наука, 1980. - 286 с.
2. Алексеева, А.А. Ферментативная активность почв лесных питомников лесостепной зоны Красноярского края / А.А. Алексеева, А. М. Алексеева, Н.В. Фомина // Вестник красноярского государственного аграрного университета. - 2014. - №12. - С. 70-75.
3. Антонов, Г. И. Оптимизация почвенного азотного фонда с использованием биоконверсии опилочной массы при искусственном лесовыращивании / Г. И. Антонов, О. Э. Кондакова, О. А. Чмуж, А. А. Поплаухин // Международная исследовательская организация «Cognito». - 2015. - С. 11-15.
4. Аристовская, Т. В. Микробиология процессов почвообразования : монография / Т. В. Аристовская. – Ленинград: Наука, 1980. - 187 с.
5. Безкоровайная, И.Н. Биологическая активность почв после несплошных рубок в сосняках красноярской лесостепи / И.Н. Безкоровайная, Г. И. Антонов, В. В. Иванов, Д. А. Семенякин // Хвойные бореальной зоны. - 2010. - №3. - С. 238-242.
6. Бугаева, К.С. Сосновые боры на северной границе Красноярской лесостепи: динамика фитоценотической структуры за последние 40 лет /

- К.С. Бугаева, Д. И. Назимова // Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. - 2009. - №9. - С. 109-118.
7. Гродницкая, И.Д. Внесение микробов-интродуцентов в лесные почвы питомников сибери / И.Д. Гродницкая, Н. Д. Сорокин // Почвоведение. - 2007. - №3. - С. 359-364.
8. Карливан В. П. Методы исследования целлюлозы : монография / В. П. Карливан. - Рига: Зинатне, 1981. – 257 с
9. Кауричев, И.С. Разложение растительных остатков и образование гумусовых веществ / И.С. Кауричев, // Известия тимирязевской сельскохозяйственной академии. - 1972. - №4. - С. 97-107.
- 10.Лакин Г. Ф. Биометрия : учебное пособие для университетов и педагогических институтов / Г. Ф. Лакин. – Москва: Высшая школа, 1973. – 352 с.
- 11.Ленскинова, Л. В. Получение биоудобрения на основе биодеструкции опилок для оптимизации деградированных почв : дис. ... канд. биол. наук : 06.01.03. / Ленскинова Лариса Викторовна. - Улан-Удэ, 2003. – 160 с.
- 12.Медведев С. С. Физиология растений : учебник / С. С. Медведев: Петербург: БХВ, 2013. – 512 с.
- 13.Мухортов, Д. И. Утилизация органических отходов при искусственном восстановлении / Д. И. Мухортов, Е. М. Романов // Вестник пгту. - 2013. - №3. - С. 20-35.
- 14.Паринкина О. М. Микрофлора тундровых почв : монография / О. М. Паринкина. – Ленинград : Наука, 1989. – 159 с

- 15.Санданова И. Б. Микробиологическая деструкция растительного опада степных экосистем Юго-Восточного Забайкалья : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16 / Санданова Ирина Батомункуевна. – Улан-Удэ, 2007. – 127 с.
- 16.Синькевич, С. М. Перспективы использования лиственнично-еловых древостоев южной карелии / С. М. Синькевич, // Лесохозяйственная информация. - 2013. - №2. - С. 36-39.
- 17.Туев, Н. А. Микробиологические процессы гумусообразования : монография / Н. А. Туев. – Москва : Агропромиздат, 1989. - 236 с
- 18.Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев. – Москва: Наука, 2005. – 252 с.
- 19.Частухин, В. Я. Биологический распад и ресинтез органических веществ в природе : монография, Москва: Наука, 1969. - 329 с.
- 20.Шарков В. И. Химия гемицеллюлоз / В. И. Шарков, Н.И. Куйбина – Лесная промышленность, 1972, 440 с.
- 21.Шлегель Г. Общая микробиология : учебник / Генрих Шлегель. - Москва: Мир, 1987. - 568 с.
- 22.Atkinson, C. F. Activities during composting of pulp and paper-mill primary solids / C. F. Atkinson, D. Jones, J. J. Gauthier // World journal of microbiology and biotechnology. - 1997. - №5. - С. 519-525.
- 23.Atkinson, C. F. Biodegradabilities and microbial activities during composting of oxidation ditch sludge / C. F. Atkinson, D. D. Jones, J. J. Gauthier // Compost science & utilization. - 1996. - Т. 4. - №1. - С. 84-96.
- 24.Baldrian, P. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi / P. Baldrian, V. Valášková // Fems microbiology reviews. - 2008. - Т. 32. - №3. - С. 501-521.

25. Bloem, J. Microbial diversity and soil functions // *European journal of soil science* / J. Bloem, J. Ascher, M. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, G. Renella // *European journal of soil science*. - 2003. - T. 54. - №4. - C. 655-670.
26. Brown, K.H. The influence of c: p ratio on the biological degradation of municipal solid waste / K.H. Brown, J. C. Bouwkamp, F. R. Gouin // *Compost science & utilization*. - 1998. - №1. - C. 53-58.
27. Cragg, S. M. Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life / S. M. Cragg, // *Current opinion in chemical biology*. - 2015. - №29. - C. 108-119.
28. Crawford, J. H. Composting of agricultural wastes -- a review / J. H. Crawford, // *Process biochemistry*. - 1983. - №18. - C. 14-18.
29. Das, M. Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream / M. Das, T. V. Royer, L. G. Leff // *Applied and environmental microbiology*. - 2007. - T. 73. - №3. - C. 756-767.
30. Demain, A. L. Cellulase, clostridia, and ethanol / A. L. Demain, M. Newcomb, J. H. D. Wu // *Microbiology and molecular biology reviews*. - 2005. - T. 69. - №1. - C. 124-154.
31. Dougherty, M. Composting for municipalities / M. Dougherty, // *Natural resource, agriculture, and engineering service*. - 1998. - №8. - C. 18-23.
32. Ebeling, E. Basic Composting: All the skills and tools you need to get started / E Ebeling, Washington: Stackpole Books, 2003. – 184 c.
33. Epstein, E. The science of composting / E. Epstein – CRC press, 1996, 214 c.

- 34.Eriksson, K. E. L. Microbial and enzymatic degradation of wood components / K. E. L. Eriksson, R. A. Blanchette, P. Ander // Applied microbiology. - 1990. - №21. - С. 89-92.
- 35.Finstein, M. S. Microbiology of municipal solid waste composting / M. S. Finstein, M. L. Morris // Advances in applied microbiology. - 1975. - Т. 19. - С. 113-151.
- 36.Floudas, D. Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes / D. Floudas // Science. - 2012. - Т. 336. - №6089. - С. 1715-1719.
- 37.Fog, K. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter / K. Fog, // Biological reviews. - 1988. - Т. 63. - №3. - С. 433-462.
- 38.Food and Agriculture Organisation of United Nations: на сайте представлены статистические данные по всем отраслям сельского и лесного хозяйства стран, входящих в ООН. - Режим доступа: <http://www.fao.org/economic/ess/en/>
- 39.Fustec, E. Lignin degradation and humus formation in alluvial soils and sediments / E. Fustec, E. Chauvet, G. Gas // Applied and environmental microbiology. - Т. 55. - №4. - 1989. - С. 922-926.
- 40.Golueke, C. G. Principles of composting / C. G. Golueke // Journal of waste recycling. - 1991. - №11. - С. 14-27.
- 41.Guillen, F. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin / F. Guillen, // International microbiology. - 2005. - №8. - С. 195-204.
- 42.Hubbe, M. A. Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: a review / M. A. Hubbe, M. Zazhad, C. Sanchez // Bioresources. - 2010. - Т. 5. - №4. - С. 2808-2854.

- 43.Kato, S. Stable coexistence of bacterial strains as a cellulose-degrading community / S. Kato, S. Haruta, Z. J. Cui, M. Ishii, Y. Igarashi // Applied environmental microbiology. - 2005. - №71. - C. 7099-7106.
- 44.Leonowicz, A. Biodegradation of lignin by white rot fungi / A. Leonowicz, A. Matuszewska, J. Luterek, D. Ziegenhagen // Fungal genetics and biology. - 1999. - T. 27. - №2-3. - C. 175-185.
- 45.Lynd, L. R. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. van Zyl, I. S. Pretorius // Microbiology and molecular biology reviews. - 2002. - T. 66. - №3. - C. 506-577.
- 46.Malherbe, S. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications / S. Malherbe, T. E. Cloete // Reviews in environmental science and biotechnology. - 2002. - T. 1. - №2. - C. 105-114.
- 47.Martins, L. F. Comparison of penicillium echinulatum and trichoderma reesei cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates / L. F. Martins, D. Kolling, M. Camassola, A. J. Dillon, L. P. Ramos // Bioresource technology. - 2008. - T. 99. - №11. - C. 1417-1424.
- 48.Mckinley, V. L. Physical and chemical correlates of microbial activity and biomass in composting municipal sewage sludge / V. L. Mckinley, J. R. Vestal // Applied and environmental microbiology. - 1985. - T. 50. - №6. - C. 1395-1403.
- 49.Moss, L. H. Evaluating risks and benefits of soil amendments used in agriculture. : науч. изд. / L. H. Moss, E. Epstein, T. J. Logan – Alexandria : Water Environment Research Foundation, 2002. – 318 с.
- 50.Ohkuma, M. Lignin degradation and roles of white rot fungi: study on an efficient symbiotic system in fungus-growing termites and its application to

- bioremediation / M. Ohkuma, Y. Maeda, T. Johjima, T. Kudo // Riken review. - 2001. - №42. - C. 39-42.
51. Partanen, P. Bacterial diversity at different stages of the composting process / P. Partanen, J. Hultman, L. Paulin, P. Auvinen, M. Romantshuk // BMC microbiology. - 2010. - T. 10. - №1. - C. 94-99.
52. Pointing, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi / S. Pointing // Applied microbiology and biotechnology. - 2001. - T. 57. - №1. - C. 20-23.
53. Ruggieri, L. Influence of different co-substrates biochemical composition on raw sludge co-composting / L. Ruggieri, T. Gea, A. Artola, A. Sanchez // Biodegradation. - 2008. - T. 19. - №3. - C. 403-415.
54. Saludes, R. B. Characterization of dairy cattle manure/wallboard paper compost mixture / R. B. Saludes, K. Iwabuchi, F. Miyatake, Y. Abe // Bioresource technology. - 2008. - T. 99. - №15. - C. 7285-7290.
55. Sasaki, M. Cellulose hydrolysis in subcritical and supercritical water / M. Sasaki, B. Kabyemela, R. Malaluan, S. Hirose // The journal of supercritical fluids. - 1998. - T. 13. - №1. - C. 261-268.
56. Sharma, A. Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase / A. Sharma, S. K. Khare, M. N. Gupta // Bioresource technology. - 2001. - T. 78. - №3. - C. 281-284.
57. Singh, A. Production of protein and cellulase by *Aspergillus niger* in solid state culture / A. Singh, A. Singh, A. B. Abidi, N. S. Darmwal, A. K. Agrawal // World journal of microbiology and biotechnology. - 1989. - T. 5. - №4. - C. 451-456.
58. Strom, P. F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting / P. F. Strom, // Applied environmental microbiology. - 1985. - №50. - C. 899-905.

- 59.Szijarto, N. Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *trichoderma reesei* rut-c30 as a response to addition of cellulose / N. Szijarto, Z. Szengyel, G. Liden, K. Reczey // *Applied biochemistry*. - 2004. - №13. - C. 115-124.
- 60.Taylor, L.E. Complete cellulase system in the marine bacterium *saccharophagus degradans* strain 2-40t / L.E. Taylor, B. Henrissat, P. M. Coutinho, N. A. Ekborg, S. W. Hutcheson, R. M. Weiner // *Journal of bacteriology*. - 2006. - T. 188. - №11. - C. 3849-3861.
- 61.Tomme, P. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi / P. Tomme, R. A. J. Warren, N. R. Gilkes // *Advances in microbial physiology*. - 1995. - T. 37. - C. 1-81.
- 62.Tuomela, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review / M. Tuomela, M. Vikman, A. Hatakka, M. Itavaara // *Bioresource technology*. - 2000. - T. 72. - №2. - C. 169-183.
- 63.Valašková, V. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* – production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases / V. Valašková, P. Baldrian // *Microbiology*. - 2006. - T. 152. - №12. - C. 3613-3622.
- 64.Varadachari, C. On humus formation / C. Varadachari, K. Chosh // *Plant and Soil*. - 1984. - T. 77. - №2-3. - C. 305-313.
- 65.Weber, S. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil / S. Weber, S. Stubner, R. Conrad // *Applied and environmental microbiology*. - 2001. - T.67. - №3. - C. 1318-1327.
- 66.Wesenberg, D. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents / D. Wesenberg, I. Kyriakides, S. N. Agathos // *Biotechnology advances*. - 2003. - T.22. - №1. - C. 161-187.

67. Willats, W.G.T. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis / W.G.T. Willats, L. McCartney, W. Mackie, J. P. Knox // Plant cell walls. – Plant molecular biology. - 2001. - №47. - C. 9-27.
68. Wojtczak, G. A comparison of the thermostability of cellulases from various thermophilic fungi / G. Wojtczak, C. Breuil, J. Yamada, J. N. Saddler // Applied microbiology and biotechnology. - 1987. - T.27. - №1. - C. 82-87.
69. Zhou, S. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi* / S. Zhou, L. O. Ingram // Journal of bacteriology. - 2000. - T.20. - №20. - C. 5676-5682.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Т. Г. Волова

« 19 » июня 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01

ВЛИЯНИЕ МИКОКОМПОСТИРОВАНИЯ ДРЕВЕСНО-ОПИЛОЧНОЙ
МАССЫ НА ФЕРМЕНТАТИВНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В
ПОЧВЕ ПОД ЕЛОВЫМИ НАСАЖДЕНИЯМИ

Руководитель Г.И. Антонов м.н.с., канд. биол. наук Г.И. Антонов

Руководитель Е.Н. Афанасова доцент, канд. биол. наук Е.Н. Афанасова

Выпускник А.А. Поплаухин А.А. Поплаухин

Красноярск 2017